**中华人民共和国行业标准**

**《地方流行性牛白血病诊断技术》编制说明**

# **一、工作简况**

## （一）任务来源

地方流行性牛白血病（Enzootic bovine leukosis，EBL)也称为牛白血病（Bovine leukosis，BL)是由牛白血病病毒（Bovine leukaemia virus，BLV）引起的具有传染性的牛肿瘤性疾病。我国《一、二、三类动物疫病病种名录》将其列为三类动物疫病。BLV是一种外源性逆转录病毒，它在结构和功能上与灵长类T淋巴病毒1、2和3（STLV-1，-2，-3）和人T淋巴病毒1和2（HTLV-1和-2）相关。BLV的主要靶细胞是B淋巴细胞。病毒颗粒包括两个正义的单链RNA，编码核蛋白p12，衣壳（核心）蛋白p24，跨膜糖蛋白gp30，包膜糖蛋白gp51和几种酶，包括逆转录酶。由病毒基因组反转录形成的前病毒DNA，和宿主细胞的DNA随机整合，在不持续产生病毒后代的情况下，在宿主细胞中一直存在。已知外源性 BLV 感染牛后主要侵害B淋巴细胞，以前病毒DNA形式终生存在于宿主细胞染色体中，因此检出外周血淋巴细胞（PBMC）中的BLV前病毒DNA可作为牛感染BLV的证据。

牛可在任何年龄（包括胚胎期）被感染,肿瘤（淋巴肉瘤）通常见于3岁以上的动物。感染通常是亚临床性感染，即不表现出临床症状，30–70％的被感染牛出现持续性淋巴细胞增多，而0.1–10％的被感染动物出现肿瘤。临床体征取决于肿瘤的部位，可能包括消化系统紊乱，食欲不振，体重减轻，虚弱或全身虚弱，有时甚至是神经系统表现。浅表淋巴结可能明显增大，在皮肤下和直肠检查时可触及。尸检时，发现淋巴结和多种组织被肿瘤细胞浸润。最常累及的器官有皱胃，心脏的右耳，脾，肠，肝，肾，胃，肺和子宫。牛白血病的传播途径较多，例如分泌物传播、乳源性传播、寄生虫传播、精液和胚胎移植传播，以及血源性传播等等。研究表明本病主要以血源性传播为主。因此在控制本病的传播过程中应该严把血源性传播的关口。在各种体液（鼻和支气管液，唾液，牛奶）的细胞中也发现存在该病毒。自然传播取决于感染细胞的转移，例如分娩过程。也会发生人工传播，例如被血液污染的直肠检查用的针头，手术设备，手套。在没有这些的情况下，横向传播通常很慢。在大量吸血昆虫（尤其是烟草）发生的地区，这些昆虫可机械传播病毒。此外，病毒抗原和前病毒DNA可以在被感染动物的精液，牛奶和初乳中发现。

BLV于19世纪出现在欧洲，20世纪上半叶，从那里传播到美洲大陆。然后，通过从北美进口牛，传播回欧洲，并被首次引入其他国家。目前此病几乎遍及全世界各养牛国家 ,特别是在欧美 ,如德国、波兰、匈牙利、保加利亚、罗马尼亚、丹麦、瑞典、俄罗斯、美国、古巴和加拿大等国流行较甚 ;亚洲的日本发生也较多。此病在我国于 1974 年首次发现于上海 ,继而在合肥、江苏、陕西、乌鲁木齐、北京、黑龙江、辽宁、昆明、长沙和江西等省市均有发生 ,且有逐渐扩大蔓延的趋势。 BLV在我国奶牛场非常普遍，个别奶牛场的个体感染率高达 49.1%，而肉牛感染率仅为1.6%。 此外，血清学检测显示，我国20.1%的牦牛呈BLV阳性。

目前已证实除可感染牛（包括牦牛、水牛以及野生牛类）外，还可以感染绵羊和山羊。BLV可将其核酸整合到感染细胞的基因组中，因此被感染的动物会终身带毒，并引起广泛的免疫功能异常，从而导致产奶量降低、产肉量下降和流产，会对牛场造成较大的经济损失。此外，有研究表明，相较于BLV阴性牛，BLV阳性牛的受孕率下降了7%；BLV阳性牛群更易感染其他传染性疾病（如，乳腺炎，腹泻和肺炎），且淘汰率更高；另外，疫苗对BLV感染牛的保护作用会有所降低。因此，在较长的亚临床感染时期，虽然没有明显的临床症状，也会引起较大的经济损失。当伴有严重的恶性消耗性症状时，牛白血病与牛结核、牛副结核等病的临床症状较为相似，应当作实验室鉴别诊断。

我国目前尚没有任何关于牛白血病综合性的临床诊断与实验室检疫标准，只有2002年颁布的《地方流行性牛白血病琼脂凝胶免疫扩散试验方法》NY/T 574-2002，已经不能适用于当前对牛白血病的流行情况调查与疫病诊断。制定相应综合性的诊断技术标准，对开展流行情况调查、疫病诊断十分必要，可为该病的防控策略的制定提供必要的技术支持。OIE在线网站《陆生动物诊断试验和疫苗手册》（Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals）中的第3.4.9章规定了牛白血病病原学和血清学检测的内容，可根据上述内容，制定我国的牛白血病行业诊断技术标准。

## （二）起草单位

本标准由农业部农产品质量安全监管局组织，归口单位为全国动物卫生标准化技术委员会，起草单位为中国动物疫病预防控制中心、青海省动物疫病预防控制中心，北京亿森宝生物科技有限公司、重庆市动物疫病预防控制中心、上海市动物疫病预防控制中心、四川省动物疫病预防控制中心、陕西省动物疫病预防控制中心、陕西省动物卫生与屠宰管理站。项目参加人员包括：孙雨、王传彬、顾小雪、翟新验、杨林、刘颖昳、徐琦、毕一鸣、蔡金山、阚威、王新杰、孙晓明、高姗姗、白雪冬、曾政、董春霞、骆璐、赵洪进、王建、杨显超、陈斌、陈弟诗、赵光明、朱宝、齐亚辉、孙航、胡冬梅、冯冰。

孙雨: 中国动物疫病预防控制中心，主持标准修订、编制及实验室研究的相关工作；

王传彬：中国动物疫病预防控制中心，负责标准的整体把握、审定；

顾小雪：中国动物疫病预防控制中心，负责ELISA方法、PCR方法的验证；

翟新验：中国动物疫病预防控制中心，负负责标准的整体把握、审定；

杨林：中国动物疫病预防控制中心，负负责标准的整体把握；

刘颖昳：中国动物疫病预防控制中心，负责临床阳性样品的收集；

徐琦：中国动物疫病预防控制中心，负责ELISA方法、PCR方法的验证；

毕一鸣：中国动物疫病预防控制中心，负责临床阳性样品的收集；

蔡金山：青海省动物疫病预防控制中心，负责标准的琼扩试验部分验；

阚威: 青海省动物疫病预防控制中心，负责临床阳性样品的收集；

王新杰；北京亿森宝生物科技有限公司，负责标准的PCR实验方法比对验证；

孙晓明；北京亿森宝生物科技有限公司，负责PCR方法部分临床样本检测；

高姗姗；北京亿森宝生物科技有限公司，负责标准的荧光定量PCR方法的验证；

白雪冬；北京亿森宝生物科技有限公司，负责ELISA方法部分临床样本检测；

曾政；重庆市动物疫病预防控制中心，负责临床阳性样品的收集；

董春霞；重庆市动物疫病预防控制中心，负责巢式PCR部分验证；

骆璐；重庆市动物疫病预防控制中心，负责巢式PCR部分验证；

赵洪进；上海市动物疫病预防控制中心，负责临床阳性样品的收集；

王建；上海市动物疫病预防控制中心，负责标准的血清学实验方法比对验证；

杨显超；上海市动物疫病预防控制中心，负责ELISA方法的敏感性验证；

陈斌；四川省动物疫病预防控制中心，负责临床阳性样品的收集；

陈弟诗；四川省动物疫病预防控制中心，负责部分琼脂凝胶免疫扩散试验；

赵光明；陕西省动物疫病预防控制中心，负责标准的血清学实验方法比对验证；

朱宝；陕西省动物疫病预防控制中心，负责ELISA方法的特异性验证；

齐亚辉；陕西省动物卫生与屠宰管理站，负责临床阳性样品的收集。

孙航：中国动物疫病预防控制中心，负责ELISA方法、PCR方法的验证；

胡冬梅：中国动物疫病预防控制中心，负责标准的血清学实验方法比对验证；

冯冰:中国动物疫病预防控制中心，负责标准的荧光定量PCR部分验证。

**（三）主要工作过程**

2021年3月，中国动物疫病预防控制中心组织专家召开标准制定研讨会，讨论标准制定思路，制定标准制定方案，明确项目任务分工，全面计划标准制定工作：

**1.标准起草阶段**

**一是查阅文献资料**：查阅了目前国内关于地方流行性牛白血病的相关法律规范要求、研究文献，部分发达国家做法、OIE《陆生动物卫生法典》和《陆生动物诊断试验和疫苗手册》的要求等。

**二是确定标准框架**：本标准的诊断方法主要参考OIE在线网站《陆生动物诊断试验和疫苗手册》（Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals）中的第3.4.9章牛白血病诊断技术。标准制定以OIE《陆生动物诊断试验和疫苗手册》推荐的检测方法和标准为依据，结合我国动物疫病预防控制机构兽医实验室以及检验检疫部门检测实验室的实验室检测工作实际，确定了本技术标准的框架。

**三是进行技术验证**：重点对标准所列的ELISA试验和PCR等方法进行验证，证实了这些试验方法的准确性与可靠性,并在此基础上，形成“标准征求意见稿”。

**2.征求意见阶段**

在上述资料收集分析、试验研究、验证试验的基础上形成了标准征求意见稿。并于2021年9月至2022年3月发放到中国农业科学院兰州兽医研究所、江西省动物疫病预防与控制中心、新疆生产建设兵团动物疫病预防与控制中心、新疆维吾尔自治区动物疾病预防控制中心、青海省动物疫病预防控制中心、新疆维吾尔自治区动物卫生监督所、普莱柯生物工程股份有限公司西南大学、青岛农业大学、北京热景生物技术股份有限公司、新疆天康生物技术股份有限公司等11家单位征求意见。征求意见单位包含了生产企业、大专院校和疫病控制机构等各有关方面。11家单位中返回意见的有11家，对征求意见稿共提出70条修改建议。这些修改建议主要集中在以下几个方面：

第一，格式方面的建议。如建议“修改文中中英文符号格式错误”、“核对附录配方中试剂的书写”、“数字与单位之间的空格不规范”等。起草者对这类建议全部接受，并利用国家标准化委员会提供的软件重新对标准征求意见稿进行修改，彻底消除标准文本格式不规范的问题。

第二是内容方面的建议。如建议将“流行病学内容不全面，补充流行病学的三间分布特点”、“引言中增加标准中规定方法的适用范围的介绍。”、“应突出该病的暴发地方流行性的可能，以及高度致死性的风险危害”等。这类建议起草者大部分接受，使本标准的文字叙述更为准确和通俗易懂。

在上述工作的基础之上，标准起草单位对70条建议进行了汇总，经过项目组人员充分讨论，最后确定采纳70条。在采纳上述意见和建议的基础上对标准进行了进一步修改完善，形成本标准送审稿。对11家单位的意见和建议的处理情况详见《标准意见汇总处理表》。

3、审查阶段

起草小组根据专家意见，通过认真仔细的整理和分析，在征求意见稿的基础上形成送审稿。

2021年11月，本标准送审稿通过动物卫生标准委员会专家预评审。本标准收到全部5位专家所给与的指导意见9条，起草小组对于这9条意见进行了采纳和认真修改完善。本标准再次修改后，形成送审稿。

2022年11月24日，全国动物卫生标准化技术委员会组织专家在青岛对农业行业标准《地方流行性牛白血病诊断技术》（送审稿）进行了审定。专家组听取了标准起草人员对标准文本、编制说明的汇报，查阅了送审稿和编制说明等文件，并对标准文本的技术内容和标准编制说明进行了质询。专家组一致认为：

该《地方流行性牛白血病诊断技术》是在充分查阅相关文献基础上，并依据获得的研究结果起草了本标准。该标准规定了地方流行性牛白血病检测方法的技术要求，适用于检测疑似感染牛白血病病毒的血液和细胞培养物中的病毒的核酸，可作为地方流行性牛白血病的辅助诊断方法和细胞培养物中病毒的鉴定；该标准内容叙述正确、简明，内容编排和层次划分清晰合理。所确定的各项技术指标和内容符合我国现行的有关政策，并与相关法律、法规一致。适合我国国情，具有实用性和可操作性。专家组原则上同意通过审定，建议标准起草小组根据专家组意见，完善文字表述后形成报批稿

4、报批阶段

2022年12月，本标准送审稿通过全国动物卫生标准化技术委员会审查会，本标准根据审查专家所给与的指导意见，进行了认真修改完善，进一步形成报批稿，呈报上级主管部门。

# **二、标准编制原则和确定标准主要内容的依据**

## （一）标准的编写原则

本标准在制定过程中坚持科学、适用、先进。第一，坚持科学性的原则，在大量收集国内外资料的基础上，筛选建立检测技术，并通过对大量临床样品的检测，对标准所列方法进行验证，对数据进行科学的统计分析，同时征求国内各行业相关专家意见，力求制定的标准科学有效；第二，坚持适用性原则，不强调所有检测方法一定是最先进的技术和最先进的方法，以符合行业实情和要求为目标，并通过在动物疫控系统兽医实验室的应用，验证标准的可操作性；第三，坚持先进性的原则，在标准制定过程中，重点参考OIE最新的《陆生动物诊断试验和疫苗手册》的相关技术内容，在国际推荐技术在我国适用的前提下，优先选择国际推荐技术方法。

## （二） 提出本标准的依据

由于目前我国缺乏地方流行性牛白血病的诊断技术标准，开展牛白血病的临床诊断、疫病监测和检验检疫等工作时会遇到实验室检测缺乏依据的问题。中国动物疫病预防控制中心参考OIE发布的《陆生动物诊断试验和疫苗手册》，结合近年来从事牛白血病监测工作的基础，提出制定本标准。

本标准的技术内容主要依据OIE《陆生动物诊断试验和疫苗手册》（Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals）中的地方流行性牛白血病章节的内容，包括了地方流行性牛白血病的血清学检测方法和PCR检测方法。同时参考我国近些年发表的地方流行性牛白血病的临床诊断病例的相关文献进行编写。

课题组从美国IDEXX公司购买了牛白血病病毒gp51抗体检测试剂盒（Enzootic Bovine Leukosis Virus （BLV）gp51 Antibody Test Kit ），为了评价市售试剂盒和方法的特性，从位于德国的OIE参考实验室购买了ELISA用的OIE弱阳性参考血清和OIE阴性参考血清，同时购买了OIE参考血清E05，对市售商品化试剂盒的敏感性、特异性等性能进行了评价，同时利用大量的田间样品进行了所述方法的有效性验证，确保了这些商品化试剂盒所列方法的适用性。

为了检测OIE《陆生动物诊断试验和疫苗手册》（Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals）中的牛白血病章节中的PCR部分的可行性，课题组分析比对了NCBI数据库中所有登陆的牛白血病病毒的env基因（OIE巢式PCR的靶标基因）及pol基因（OIE实时荧光PCR的靶标基因）的序列。env基因的登陆序列较多，因此只选取了中国的序列做比对（具体见附件“env,BLV,china.fasta”），比对结果发现OIE提供的巢式PCR引物序列需加简并碱基。Pol基因的登陆序列较少，比对后发现，OIE的实时荧光PCR的引物及探针和下载的序列完全一致，因此可直接使用。此外，本课题组用临床样本验证了两种PCR方法（巢式PCR法和实时荧光定量PCR法），并对扩增产物进行了一代测序，证实了两种方法的适用性。

## （三）制定本标准的基础

## 标准制定单位中国动物疫病预防控制中心是具有独立法人资格的正局级事业单位，隶属农业农村部领导，业务归口农业农村部畜牧兽医局管理。目前拥有研究员16名、副研究员31名，34人具有博士学位。课题组所在部门农业部兽医诊断中心是1996年经农业农村部批准成立的国家级动物疫病检测实验室，承担全国动物疫病、人畜共患病诊断工作，协调各级兽医实验室诊断工作。农业部兽医诊断中心现有生物安全二级（BSL-2）实验室，建筑面积4780m2，生物安全三级（BSL-3）实验室以及动物生物安全三级（ABSL-3）动物房共2478 m2，拥有数字PCR、酶联免疫工作站、荧光显微镜等800多台（件）高精尖仪器设备。2000年，农业部兽医诊断中心通过国家计量认证，2009年，通过了农产品质量安全检测机构考核，目前可以对外开展禽流感、口蹄疫、猪繁殖与呼吸综合征、布鲁氏菌病等43种疫病、80个参数的实验室检测。2012年5月，农业部兽医诊断中心被世界动物卫生组织（OIE）指定为OIE猪繁殖与呼吸综合征参考实验室。

## 本课题组从2014年开始承担农业农村部的我国牧区半牧区省份牛羊主要疫病流行情况调查项目以及我国三类地区布鲁氏菌病流行情况调查项目，2017年课题组开始承担种牛羊场和全国屠宰交易环节牛羊主要疫病的监测项目。在完成上述监测任务过程中，2014年开始，对全国各个省市的养殖场、屠宰场和散养户多个养殖环节开展了牛白血病的监测，通过这些监测工作的开展，了解了我国牛白血病的流行情况，同时通过对不同的牛白血病的诊断技术的比对，对牛白血病的诊断技术较为熟悉，以上工作对标准为标准制定工作提供了较好的基础。

## 实验内容

目前市售的商品化牛白血病诊断试剂较少，课题组从美国IDEXX公司购买了牛白血病病毒gp51抗体检测试剂盒（Enzootic Bovine Leukosis Virus （BLV）gp51 Antibody Test Kit）与牛白血病琼脂凝胶免疫扩散（AGID）试剂盒。为了评价市售试剂盒和方法的特性，从位于德国的OIE参考实验室购买了ELISA用OIE弱阳性参考血清和OIE阴性参考血清，同时购买了OIE参考血清E05,对市售商品化试剂盒的敏感性、特异性等性能进行了评价，同时利用大量的田间样品进行了所述方法均有效性验证，确保了这些商品化试剂盒所列方法的适用性。

OIE提供了两种牛白血病病毒PCR检测方法，即巢式PCR方法和实时PCR方法。用这两种PCR方法检测临床样本，由于未找到较权威的市售的牛白血病病毒的PCR检测试剂盒，因此用一代测序的方法对PCR产物进行测序，以确定结果的正确。此外，本课题组实验还评价了这两种PCR的特异性和灵敏性，结果证明这两种方法特异性和灵敏性均较好。

## 实际应用效果

应用标准所列ELISA检测方法对采集自新疆、青海和甘肃等全国26个省（市）的养殖场、屠宰场、散养户牛血清共3120份进行检测，其中每个省份样品总数为120份，结果检出阳性牛血清59份，阴性牛血清3061份。血清阳性率为1.89%（见表3）。

新疆维吾尔自治区动物疾病预防控制中心验证结果：使用中国动物疫病预防控制中心提供的酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂盒对30份牛阳性血清、30份牛阴性血清进行检测，结果30份牛阳性血清均为阳性结果，30份牛阴性血清均为阴性结果。使用中国动物疫病预防控制中心提供的PCR检测试剂对20份阳性样本、20份阴性样本进行检测，结果20份阳性样本均为阳性结果，20份阴性样本均为阴性结果。

青海省动物疫病预防控制中心验证结果：使用中国动物疫病预防控制中心提供的酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂盒对30份牛阳性血清、30份牛阴性血清进行检测，结果30份牛阳性血清均为阳性结果，30份牛阴性血清均为阴性结果。使用中国动物疫病预防控制中心提供的PCR检测试剂对20份阳性样本、20份阴性样本进行检测，结果20份阳性样本均为阳性结果，20份阴性样本均为阴性结果。

新疆生产建设兵团动物疫病预防控制中心验证结果：使用中国动物疫病预防控制中心提供的酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂盒对30份牛阳性血清、30份牛阴性血清进行检测，结果30份牛阳性血清均为阳性结果，30份牛阴性血清均为阴性结果。使用中国动物疫病预防控制中心提供的PCR检测试剂对20份阳性样本、20份阴性样本进行检测，结果20份阳性样本均为阳性结果，20份阴性样本均为阴性结果。

**三、主要试验或验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果**

## （一）主要试验或验证的分析

1.血清学试验

1.1 目前商品化试剂盒方法的比较

1.1.1 试剂盒选择：目前市售比较成熟的牛白血病抗体检测试剂盒是美国IDEXX公司牛白血病病毒 gp51 抗体检测试剂盒（Enzootic Bovine Leukosis Virus （BLV）gp51 Antibody Test Kit ）与牛白血病琼脂凝胶免疫扩散（AGID）试剂盒。为了评价市售试剂盒和方法的特性，课题组从位于德国的OIE参考实验室购买了ELISA用OIE弱阳性参考血清和OIE阴性参考血清，同时购买了OIE参考血清E05，对市售商品化试剂盒的敏感性、特异性等性能进行评价。

1.1.2试验操作：参照试剂盒操作方法进行，经比较美国IDEXX公司的牛白血病病毒 gp51 抗体检测试剂盒（Enzootic Bovine Leukosis Virus （BLV）gp51 Antibody Test Kit ）与牛白血病琼脂凝胶免疫扩散（AGID）试剂盒所列操作方法同OIE《陆生动物诊断试验和疫苗手册》（Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals）所列的ELISA操作方法一致。

1.1.3 质控血清的检测结果：使用美国IDEXX公司的牛白血病病毒 gp51 抗体检测试剂盒（Enzootic Bovine Leukosis Virus （BLV）gp51 Antibody Test Kit ）和牛白血病琼脂凝胶免疫扩散（AGID）试剂盒，检测OIE弱阳性参考血清、OIE阴性参考血清、OIE参考血清E05。结果，病毒抗体ELISA检测试剂盒与牛白血病琼脂凝胶免疫扩散（AGID）试剂盒对相关参考血清的检测效果均较好，见表1。

**表1 牛白血病病毒抗体检测试剂盒对参考血清的检测结果**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | OIE参考血清E05 | OIE弱阳性参考血清 | OIE阴性参考血清 |
| S/N% | 12 | 27 | 95 |

注：判定标准：S/N%=100×A/N；S/N%≥40，为抗体阴性；S/N%<40，为抗体阳性。

**表2 牛白血病琼脂凝胶免疫扩散（AGID）试剂盒对参考血清的检测结果**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | OIE参考血清E05 | OIE弱阳性参考血清 | OIE阴性参考血清 |
| AGID结果 | + | + | - |

注：阳性对照血清孔与抗原孔之间形成一条清晰、致密的白色沉淀线；弱阳性对照血清孔与抗原之间形成一条比较清晰、但不致密的白色沉淀线；血清与抗原没有形成一条特异性沉淀线，并且不使阳性对照血清线弯曲,判为阴性。

1.1.4 病毒抗体ELISA检测方法与琼脂凝胶免疫扩散（AGID）方法的分析敏感性测定： 将OIE参考血清E05分别用10份混合血清样品和单份血清样品进行系列稀释，同时进行检测，每个稀释度设2个重复，以检出阳性结果的最高稀释倍数作为灵敏度分析结果。牛白血病病毒 gp51 抗体检测试剂盒（Enzootic Bovine Leukosis Virus （BLV）gp51 Antibody Test Kit ）和牛白血病琼脂凝胶免疫扩散（AGID）试剂盒对OIE参考血清E05的最高稀释倍数均为1：100（10份混合血清样品）和1：10（单份血清样品）。

1.1.5 病毒抗体ELISA检测方法及琼脂凝胶免疫扩散（AGID）方法交叉反应试验：采用牛O型口蹄疫、牛A型口蹄疫、牛布病、牛结核、牛传染性支气管炎、牛病毒性腹泻等抗体阳性血清各4份，应用牛白血病抗体ELISA检测方法与琼脂凝胶免疫扩散（AGID）方法进行检测，结果显示检测方法与上述疫病的抗体阳性血清均无交叉反应。

1.1.6 田间应用试验： 应用标准所列ELISA检测方法对采集自新疆、青海和甘肃等全国26个省（市）的养殖场、屠宰场、散养户牛血清共3120份进行检测，其中每个省份样品总数为120份，结果检出阳性牛血清59份，阴性牛血清3061份。血清阳性率为1.89%（见表3）。其中从贵州省收集的样品中检出阳性样本12份，阳性率为10%；从湖南省和西藏自治区收集份样品中各检测出6份阳性样本，阳性率均为5%；从甘肃省、宁夏、青海和广西自治区收集份样品中各检测出4份阳性样本，阳性率均为3.33%；内蒙古自治区收集的样品中检测出阳性样品3份，阳性率2.5%；湖北省、湖南省、四川省各检出8份阳性样本，阳性率均为6.67%；宁夏自治区、新疆生产建设兵团各检出7份阳性样品，阳性率为5.83%； 西藏自治区、青海省、重庆市、云南省各检出阳性样品6份阳性样品，阳性率为5%；山西省、陕西省检出5份阳性样品，阳性率为4.17%；内蒙古自治区、浙江省、天津市各检出4份阳性样本，阳性率3.33%；福建省检出3份阳性样本，阳性率为2.5%；山西省、陕西省、浙江省、上海市和湖北市各检出2份阳性样本，阳性率均为1.67%；河南省、辽宁、黑龙江省、新疆兵团和北京市各检出了1份阳性样品，阳性率为0.83%；其余省份均未检测出阳性样本。

**表3 牛白血病抗体ELISA检测方法的应用试验结果**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 动物来源 | | 临床牛血清的检测 | 阳性数（份） | 阳性率（%） | 阳性率（%） |
| 河南1 | 养殖场 | 60 | 0 | 0 | 0.83 |
| 屠宰场 | 40 | 0 | 0 |
| 散养户 | 20 | 1 | 5 |
| 山西2 | 养殖场 | 60 | 1 | 1.67 | 1.67 |
| 屠宰场 | 40 | 1 | 2.5 |
| 散养户 | 20 | 0 | 0 |
| 内蒙古3 | 养殖场 | 60 | 2 | 3.33 | 2.5 |
| 屠宰场 | 40 | 1 | 2.5 |
| 散养户 | 20 | 0 | 0 |
| 吉林0 | 养殖场 | 60 | 0 | 0 | 0 |
| 屠宰场 | 40 | 0 | 0 |
| 散养户 | 20 | 0 | 0 |
| 辽宁1 | 养殖场 | 60 | 1 | 1.67 | 0.83 |
| 屠宰场 | 40 | 0 | 0 |
| 散养户 | 20 | 0 | 0 |
| 陕西2 | 养殖场 | 60 | 0 | 0 | 1.67 |
| 屠宰场 | 40 | 1 | 2.5 |
| 散养户 | 20 | 1 | 5 |
| 甘肃4 | 养殖场 | 60 | 0 | 0 | 3.33 |
| 屠宰场 | 40 | 2 | 5 |
| 散养户 | 20 | 2 | 10 |
| 黑龙江1 | 养殖场 | 60 | 0 | 0 | 0.83 |
| 屠宰场 | 40 | 1 | 2.5 |
| 散养户 | 20 | 0 | 0 |
| 河北0 | 养殖场 | 60 | 0 | 0 | 0 |
| 屠宰场 | 40 | 0 | 0 |
| 散养户 | 20 | 0 | 0 |
| 宁夏4 | 养殖场 | 60 | 2 | 3.33 | 3.33 |
| 屠宰场 | 40 | 0 | 0 |
| 散养户 | 20 | 2 | 10 |
| 青海4 | 养殖场 | 60 | 2 | 3.33 | 3.33 |
| 屠宰场 | 40 | 1 | 2.5 |
| 散养户 | 20 | 1 | 5 |
| 西藏6 | 养殖场 | 60 | 2 | 3.33 | 5 |
| 屠宰场 | 40 | 2 | 5 |
| 散养户 | 20 | 2 | 10 |
| 新疆2 | 养殖场 | 60 | 1 | 6.66 | 1.67 |
| 屠宰场 | 40 | 0 | 0 |
| 散养户 | 20 | 1 | 5 |
| 新疆兵团1 | 养殖场 | 60 | 0 | 0 | 0.83 |
| 屠宰场 | 40 | 0 | 0 |
| 散养户 | 20 | 1 | 5 |
| 浙江2 | 养殖场 | 60 | 1 | 1.66 | 1.67 |
| 屠宰场 | 40 | 0 | 0 |
| 散养户 | 20 | 1 | 5 |
| 上海2 | 养殖场 | 60 | 0 | 0 | 1.67 |
| 屠宰场 | 40 | 1 | 2.5 |
| 散养户 | 20 | 1 | 5 |
| 湖北2 | 养殖场 | 60 | 0 | 0 | 1.67 |
| 屠宰场 | 40 | 0 | 0 |
| 散养户 | 20 | 2 | 10 |
| 湖南6 | 养殖场 | 60 | 3 | 5 | 4.17 |
| 屠宰场 | 40 | 2 | 5 |
| 散养户 | 20 | 0 | 0 |
| 福建0 | 养殖场 | 60 | 0 | 0 | 0 |
| 屠宰场 | 40 | 0 | 0 |
| 散养户 | 20 | 0 | 0 |
| 贵州12 | 养殖场 | 60 | 9 | 15 | 10 |
| 屠宰场 | 40 | 1 | 2.5 |
| 散养户 | 20 | 2 | 10 |
| 广西4 | 养殖场 | 60 | 2 | 3.33 | 3.33 |
| 屠宰场 | 40 | 2 | 5 |
| 散养户 | 20 | 0 | 0 |
| 重庆0 | 养殖场 | 60 | 0 | 0 | 0 |
| 屠宰场 | 40 | 0 | 0 |
| 散养户 | 20 | 0 | 0 |
| 云南0 | 养殖场 | 60 | 0 | 0 | 0 |
| 屠宰场 | 40 | 0 | 0 |
| 散养户 | 20 | 0 | 0 |
| 北京1 | 养殖场 | 60 | 0 | 0 | 1.67 |
| 屠宰场 | 40 | 1 | 2.5 |
| 散养户 | 20 | 0 | 0 |
| 天津0 | 养殖场 | 60 | 0 | 0 | 0 |
| 屠宰场 | 40 | 0 | 0 |
| 散养户 | 20 | 0 | 0 |
| 四川0 | 养殖场 | 60 | 0 | 0 | 0 |
| 屠宰场 | 40 | 0 | 0 |
| 散养户 | 20 | 0 | 0 |
| 总计 |  | 3120 | 59 | 1.89 | 1.89 |

**2.巢式PCR实验**

**2.1序列比对**

建立标准所列的巢式PCR检测方法过程中，课题组分析比对了NCBI数据库中所有登录的牛白血病病毒的env基因序列，尤其是中国序列，对OIE提供的巢式PCR引物进行了重点比对。研究发现env基因遗传精确性较高，可以被用做病毒核酸检测的目标基因。最终本标准选用env基因作为病毒核酸检测的目标基因，建立了检测env基因序列的巢式PCR检测方法。

**2.2 引物设计与扩增的特异性片段**

牛白血病病毒env基因遗传精确性最高，常被用做病毒核酸检测的目标基因。本巢式PCR采用env基因设计了巢式PCR引物，引物序列和扩增产物的大小见表4。

**2.2.1 引物序列**

**表4 env基因引物序列和扩增产物大小**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **引物名称** | **序列** | **长度** | **扩增片段大小** |
| BLV-env-1 | TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA | 22bp | 598bp |
| BLV-env-2 | AACAACAACCTCTGGGAAGGG | 21bp |
| BLV-env-3 | CCCACAAGGGCGGCGCCGGTTT | 22bp | 444bp |
| BLV-env-4 | GCGAGGCCGGGTCCAGAGCTGG | 22bp |

**2.2.2 扩增的片段序列**

**2.2.2.1 牛白血病病毒env基因第一轮扩增片段序列**

TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATACACCTTGGACTCTGTAAATGGCTATCCTAAGATCTACTGGCCCCCCCCACAAGGGCGGCGCCGGTTTGGAGCCAGGGCCATGGTCACATATGATTGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGGTTCGACTGCCCCCACTGGGACAATGCCTCCCAGGCTGATCAAGGATCCTTTTATGTCAATCATCAGATTTTATTCCTGCATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTAACCTGGGAGATATGGGGATATGATCCCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTTCCCCAGTTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAAACAGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAATATTAGTATATAACAAAACCATCTCCAGCTCTGGACCCGGCCTCGCCCTCCCGGACGCCCAAATCTTCTGGGTCAACTCGTCCTCGTTTAACACCACCCAAGGATGGCACCACCCTTCCCAGAGGTTGTTGTT

**2.2.2.2 牛白血病病毒env基因第二轮扩增片段序列**

CCCACAAGGGCGGCGCCGGTTTGGAGCCAGGGCCATGGTCACATATGATTGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGGTTCGACTGCCCCCACTGGGACAATGCCTCCCAGGCTGATCAAGGATCCTTTTATGTCAATCATCAGATTTTATTCCTGCATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTAACCTGGGAGATATGGGGATATGATCCCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTTCCCCAGTTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAAACAGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAATATTAGTATATAACAAAACCATCTCCAGCTCTGGACCCGGCCTCGC

**2.3 检测方法的确定**

通过大量半巢式PCR试验反复摸索，最终确定检测方法条件如下：

**2.3.1 PCR反应体系与反应条件**

第一轮PCR扩增：

|  |  |
| --- | --- |
| **组成** | **体积（μL）** |
| （10x）PCR缓冲液 | 5 |
| 引物BLV-env-1(20pmol/μl) | 1.25 |
| 引物BLV-env-2(20pmol/μl) | 1.25 |
| dNTP（每个25mM） | 0.15 |
| MgCl2（25mM） | 3 |
| Taq聚合酶（1.25U） | 0.25 |
| 蒸馏水 | 19.1 |
| 模板（约1 µg DNA） | 20 |
| 总计 | 50 |

按如下条件进行PCR反应：94℃预变性2min；95℃变性30s，58℃退火30s，72℃延伸60s，30个循环；72℃终延伸4min。

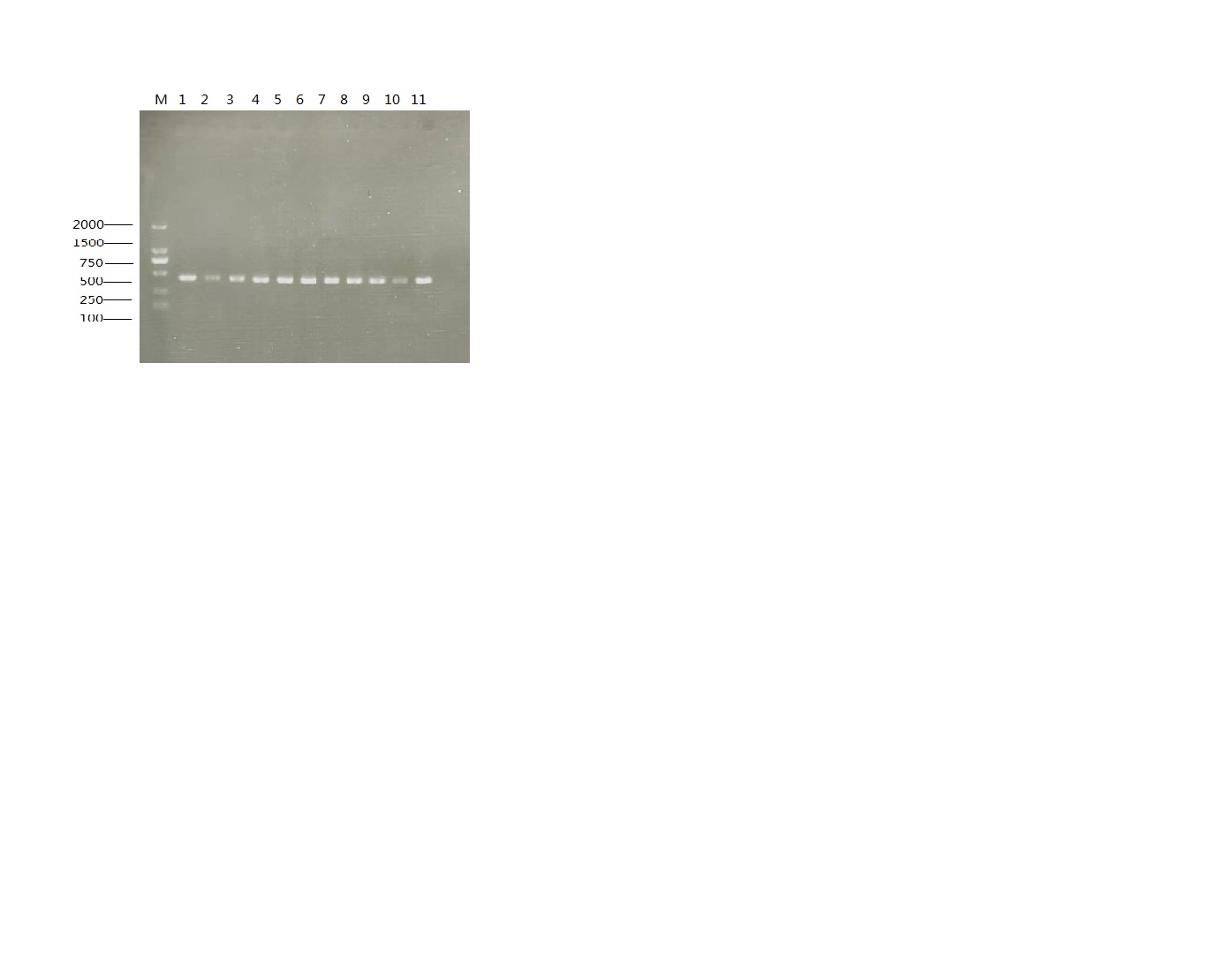
第二轮PCR扩增：

|  |  |
| --- | --- |
| **组成** | **体积（μL）** |
| (10×) PCR buffer | 5 |
| 引物BLV-env-3(20pmol/μl) | 1.25 |
| 引物BLV-env-4(20pmol/μl) | 1.25 |
| dNTP（每个25mM） | 0.15 |
| MgCl2（25mM） | 3 |
| Taq聚合酶（1.25U） | 0.25 |
| 蒸馏水 | 36.1 |
| 模板（第一轮PCR产物） | 3 |
| 总计 | 50 |

按如下条件进行PCR反应：94℃预变性2min；95℃变性30s，58℃退火30s，72℃延伸60s，30个循环；72℃终延伸4min。

**2.3.2 PCR产物电泳**

PCR反应最佳退火温度的确定：取阳性对照，PCR反应条件为：94℃预变性2min；95℃变性30s，设置温度梯度55℃~60℃退火30 s，72℃延伸1min，30个循环；72℃延伸4min。用2%的凝胶进行电泳检测，见图1、2，因此确定BLV第一轮最佳退火温度以及第二轮最佳退火温度应均为58℃。取PCR扩增产物5μL经2%琼脂糖凝胶电泳，在凝胶成像系统中观察结果，见图1。

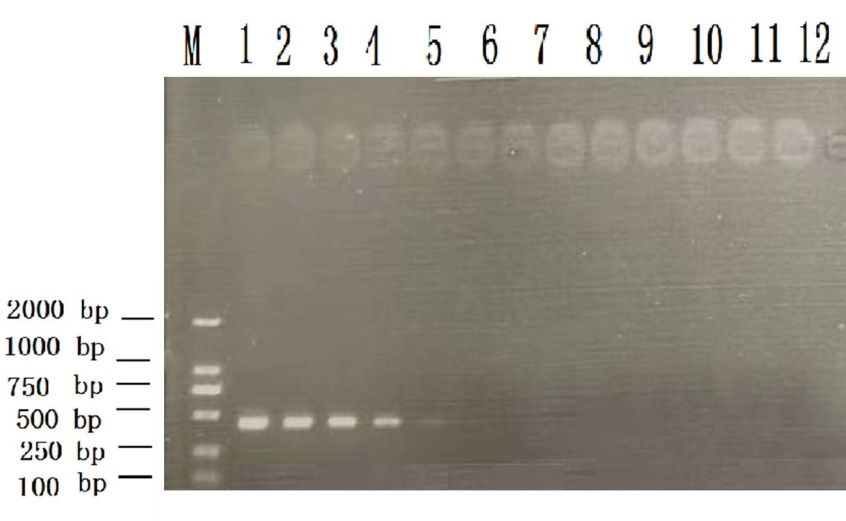
****

**图1：牛白血病巢式PCR扩增产物电泳图**

M：DL2000 DNA 分子质量标准；1-11：55 ℃～65℃ PCR退火温度梯度电泳图.

**2.4检测方法的敏感性**

取含有env序列的质粒作为阳性对照模板。将浓度为1μg/mL的标准阳性对照模板依次进行10倍倍比稀释，用PCR方法进行检测，以检出阳性结果的最高稀释倍数作为灵敏度分析结果。结果显示，浓度为1μg/mL的阳性对照模板稀释至1pg/μL后，所建立的PCR方法依然可检测到阳性条带；浓度为1μg/mL的阳性对照模板稀释至0.1pg/μL后，所建立的PCR方法依然可检测到阳性条带,见图2。



**图2 牛白血病巢式PCR检测方法的敏感性结果**

M：DL 2000 DNA 分子质量标准；1-5：阳性对照模板稀释为1ng/μL、100pg/μL、10pg/μL、1pg/μL、0.1pg/μL后PCR的扩增结果.

**2.5检测方法的特异性**

PCR鉴定方法的特异性试验：分别取BLV的临床毒株，以及牛O型口蹄疫病毒、牛A型口蹄疫病毒、牛传染性鼻气管炎病毒、牛布鲁氏杆菌、牛病毒性腹泻病毒等病原的疫苗毒株作为检测样本，应用巢式PCR方法进行检测。用2%的凝胶进行电泳检测。其中分别在对应的BLV毒株中均能扩增出相应大小片段的条带。而在牛O型口蹄疫病毒、牛A型口蹄疫病毒、牛传染性鼻气管炎病毒、牛布鲁氏杆菌、牛病毒性腹泻病毒中均没有扩增出任何条带。证实了env基因引物PCR具有有良好的特异性（见图3）。

****

**图3：牛白血病巢式PCR检测方法的特异性结果**

M：DL 2000 DNA 分子质量标准；1：阳性对照模板的PCR扩增结果；2-6：牛O型口蹄疫病毒、牛A型口蹄疫病毒、牛传染性鼻气管炎病毒、牛布鲁氏杆菌、牛病毒性腹泻病毒等病原的疫苗毒株PCR扩增结果；7：阴性对照模板的PCR扩增结果

用收集保藏的17株牛白血病临床分离毒株进行复核验证，均能使用该方法扩增出相应条带。

1. **实时荧光PCR**

**3.1序列比对**

建立标准所列的实时PCR检测方法过程中，课题组分析比对了NCBI数据库中所有登录的牛白血病病毒的pol基因序列，对OIE提供的实时PCR引物进行了重点比对。研究发现pol基因遗传精确性较高，可以被用做病毒核酸检测的目标基因。最终本标准选用pol基因作为病毒核酸检测的目标基因，建立了检测pol基因序列的实时PCR检测方法。

**3.2 引物设计与扩增的特异性片段**

牛白血病病毒pol基因遗传精确性很高，常被用做病毒核酸检测的目标基因。本实时PCR采用pol基因设计了实时PCR的引物和探针，引物探针序列和扩增产物的大小见表5。

**3.2.1 引物序列**

**表5 pol基因引物序列和扩增产物大小**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **引物名称** | **序列** | **引物长度** | **扩增片段大小** |
| MRBLVL | CCTCAATTCCCTTTAAACTA | 20bp | 120bp |
| MRBLVR | GTACCGGGAAGACTGGATTA | 20bp |
| MRBLV probe | 6FAM GAACGCCTCCAGGCCCTTCA BHQ1 | 20bp |

**3.2.2 扩增的片段序列**

CCTCAATTCCCTTTAAACTAGAACGCCTCCAGGCCCTTCAAGACCTGGTCCATCGCTCTCTGGAGGCAGGTTATATCTCCCCCTGGGACGGGCCAGGCAATAATCCAGTCTTCCCGGTAC

**3.3 检测方法的确定**

通过大量实时PCR试验反复摸索，最终确定检测方法条件如下：

**3.3.1 PCR反应体系与反应条件**

|  |  |
| --- | --- |
| **组成** | **体积（μL）** |
| 2 × PCR master mix | 12.5 |
| 引物MRBLVL(10μmol/L) | 1 |
| 引物MRBLVR(10μmol/L) | 1 |
| MRBLV probe(10μmol/L) | 0.5 |
| 模板（基因组DNA，500ng） | X(一般为5) |
| 双蒸水 | 10-X |
| 总计 | 25 |

反应程序**：**95℃，15分钟；94℃，60秒，60℃，60秒，50个循环。

**3.4 结果解释**

**3.4.1** 阳性样品是那些Ct小于或等于40的样品。

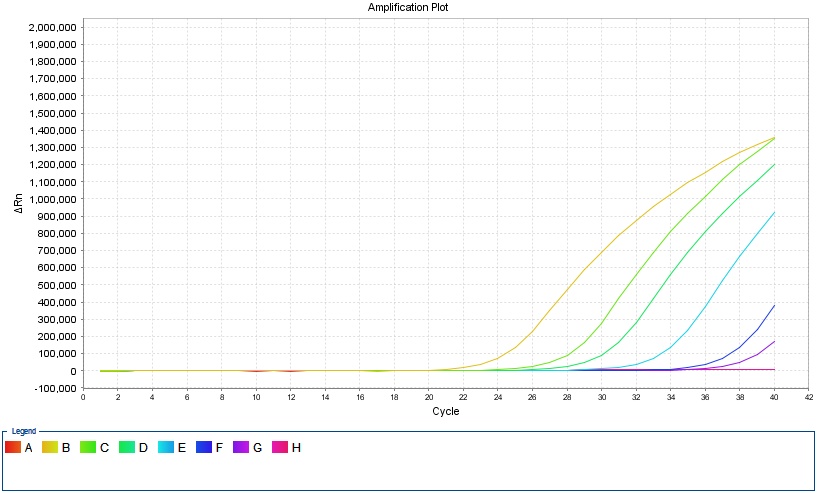
**3.4.2** 阴性样品是那些没有Ct值的样品或那些值大于40的样品。

**3.4.3** 如果阳性对照仍为阴性，或阴性水对照为阳性，则必须重复测定。临界值（即Ct40）应重新测试并确认。

**3.5 检测方法的灵敏性**

将带有pol基因目的片段的阳性质粒，稀释至1.0×106拷贝/μl，作为灵敏性质控品，用去离子水将灵敏性质控品10倍梯度稀释至1.0×105拷贝/μl、1.0×104拷贝/μl、1.0×103拷贝/μl、1.0×102拷贝/μl、1.0×101拷贝/μl、1.0×100拷贝/μl、1.0×10-1拷贝/μl。

灵敏性试验结果如图表所示，本标准的试剂对灵敏性质控品可检测到1.0×101拷贝/μl，因此，本标准的试剂灵敏性良好。详见下图4、表6。



1

2

3

4

5

6

1-6：阳性对照模板稀释为1.0×106拷贝/μl、1.0×105拷贝/μl、1.0×104拷贝/μl、1.0×103拷贝/μl、1.0×102拷贝/μl、1.0×101拷贝/μl后荧光PCR的扩增结果。

**图4：牛白血病荧光PCR检测方法的敏感性结果**

**表6 pol基因灵敏性实验结果**

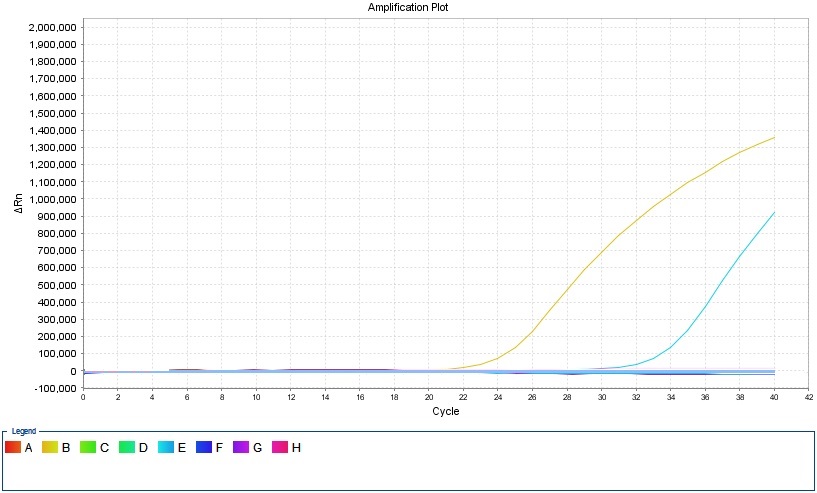
| 重复 | 检验项 | pol基因检测灵敏性质控样品（拷贝/μl） | | | | | | | | | | | | | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1.0×106 | | 1.0×105 | | 1.0×104 | | 1.0×103 | | 1.0×102 | | 1.0×101 | | 1.0×100 | | 1.0×10--1 | |
| Ct值 | 判定 | Ct值 | 判定 | Ct值 | 判定 | Ct值 | 判定 | Ct值 | 判定 | Ct值 | 判定 | Ct值 | 判定 | Ct值 | 判定 |
| 重复1 | Pol | 20.38 | + | 22.44 | + | 25.37 | + | 29.48 | + | 33.71 | + | 37.58 | + | Unde | - | Unde | - |
| 重复2 | Pol | 20.46 | + | 22.36 | + | 25.45 |  | 29.57 |  | 33.82 |  | 37.42 |  | Unde | - | Unde | - |
| 重复3 | Pol | 20.40 | + | 22.49 | + | 25.57 |  | 29.40 |  | 33.85 |  | 37.50 |  | Unde | - | Unde | - |

注：“Unde”为未检测到荧光信号，“-”表示检测结果判定为阴性，“+”表示检测结果判定为阳性。

用收集保藏的17株牛白血病临床分离毒株进行复核验证，使用该方法进行扩增，均有相应的扩增曲线出现。

**3.6 检测方法的特异性**

实时PCR鉴定方法的特异性试验：分别取BLV的临床毒株，以及牛O型口蹄疫病毒、牛A型口蹄疫病毒、牛传染性鼻气管炎病毒、牛布鲁氏杆菌、牛病毒性腹泻病毒等病原的疫苗毒株作为检测样本，应用实时PCR方法进行检测。结果显示BLV毒株呈阳性扩增。而在牛O型口蹄疫病毒、牛A型口蹄疫病毒、牛传染性鼻气管炎病毒、牛布鲁氏杆菌、牛病毒性腹泻病毒中均呈阴性扩增。证实了基于pol基因的实时荧光 PCR具有有良好的特异性。

****

3-7

2

1

**图4：牛白血病荧光PCR检测方法的敏感性结果**

1：阳性对照模板的荧光PCR扩增结果；2：BLV病毒的荧光PCR扩增结果；3-7：牛O型口蹄疫病毒、牛A型口蹄疫病毒、牛传染性鼻气管炎病毒、牛布鲁氏杆菌、牛病毒性腹泻病毒等病原的疫苗毒株荧光PCR扩增结果

**表7 检测方法的特异性**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **检测类型** | **特异性样品** | **CT值** |
| 特异性检测实验 | BLV阳性对照 | 25.62 |
| BLV病毒 | 33.28 |
| 牛O型口蹄疫病毒 | 无 |
| 牛A型口蹄疫病毒 | 无 |
| 牛传染性鼻气管炎病毒 | 无 |
| 牛布鲁氏杆菌 | 无 |
| 牛病毒性腹泻病毒 | 无 |

**（二）预期的经济效果**

本标准的实施，将有助于对牛白血病的流行病学调查、诊断和监测，可大幅减少该病对我国牛羊养殖业所造成的经济损失，促进我国养殖业的健康发展。

# **四、采用国际标准和国外先进标准的程度**

本标准的制定参考了世界动物卫生组织（OIE）的出版的《陆生动物诊断试验和疫苗手册》（Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals）中的第3.4.9章的内容，所规定的方法符合OIE的国际标准要求，敏感特异，可操作性强。

# **五、与现行的法律、法规和强制性国家标准的关系**

本标准的制定是为了更好地贯彻《中华人民共和国动物防疫法》和《中华人民共和国进出境动物检疫法》，与现行的法律、法规和强制性国家标准无任何冲突。

# **六、重大分歧意见的处理经过和依据**

无。

# **七、标准性质（强制性，推荐性）的建议，特别是对建议批为强制性标准的理由应充分说明**

建议批准为推荐性标准。

# **八、贯彻标准的要求和建议措施（组织实施、技术措施、过渡办法等）**

作为推荐性行业标准，建议在组织实施时由国家农业行政主管部门向社会公布，各级兽医实验室参照此标准进行牛白血病诊断检测工作。

# **九、废止现行有关标准的建议**

无。

# **十、其他应予说明的事项**

无。